

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) iCAR/TCR ハイブリッド T 細胞を用いた次世代型がん免疫療法の創出
(英語) Development of next generation cancer immunotherapy using iCAR/TCR hybrid
T cells

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 小林 栄治
(英語) Eiji Kobayashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人富山大学 学術研究部医学系 助教
(英語) Academic Assembly, Faculty of Medicine, University of Toyama • Assistant professor

II 研究開発の概要

Chimeric antigen receptor (CAR)-T および T 細胞受容体 (TCR) -T 療法は 2030 年頃にはがん医療における標準治療法となり、数兆円規模の市場を形成すると試算されている。しかしながら、CAR-T 療法は CD19 陽性 B リンパ腫など適応が限られていることや、強い副作用が克服すべき重要な課題になっており、これらの課題克服を目指した CAR-T の開発が盛んに行われている。また、がん抗原特異的 TCR を用いた TCR-T 療法も新たながん免疫療法として注目され、世界中で開発が進められている。しかし、これらは数種類の抗原に対する TCR を用いた臨床試験に限定されている。その主な理由として、がん退縮を誘導できる効果的な TCR 遺伝子を効率的に取得することが困難なことが挙げられる。

そのような状況下、我々は免疫系に重要な分子 A(特許申請のため非公開)に着目し、作製したヒト化抗分子 A 抗体を用い、分子 A の機能を明らかにしてきた。同時に、単一 B 細胞から抗体遺伝子を効率よく取得できる技術「ISAAC 法」(Jin et al *Nat Med* 2009) や単一 T 細胞から網羅的に TCR 遺伝子を単離・解析できる技術「hTEC10 法」(Kobayashi et al *Nat Med* 2013)を開発した。本研究開発では、我々独自の基盤技術やシーズを統合し、CAR-T と TCR-T 細胞療法の長所を兼ねた次世代型遺伝子改変 T 細胞の開発を行った。具体的には、単独では活性化しない不完全型分子 A CAR (incomplete CAR: iCAR) 遺伝子と分子 B (特許申請のため非公開)特異的 TCR 遺伝子を導入したハイブリッド T 細胞の開発を行った。ハイブリッド T 細胞は iCAR による特異性とシグナル伝達補助という機能を持つが、iCAR 単独では T 細胞は活性化されないため、T 細胞自身に発現する抗原に対しても CAR を用いることができる。一方、抗原特異的な TCR からのシグナル伝達が iCAR からのシグナルにより増強するため、TCR からのシグナルを増強することが可能になり、T 細胞に強い細胞傷害活性が誘導される。このように、ハイブリッド T 細胞は強い抗原特異的活性化と 2 重特異性による副作用の低減や広汎ながん種への適応拡大が期待できる。

第一に、機能的な抗分子 A-CAR の *in vitro* および *in vivo* での抗腫瘍効果を検討した。そのため、まず分子 A-CAR の発現ベクターを作製し、健康人末梢血 T リンパ球に導入し、細胞表面への発現を確認した。次に、抗分子 A-CAR 導入 T リンパ球を用いて、分子 A を発現する細胞株に対する細胞傷害活性を測定したところ、分子 A に特異的な細胞傷害活性を確認した。さらに、分子 A を発現する細胞株を高度免疫不全マウス (一般名 NSG マウス) に植え付けた担がんモデルを作製し、このマウスに抗分子 A-CAR 導入 T リンパ球を移入したところ、有意な腫瘍退縮効果が認められた。

第二に、分子 B 特異的 TCR の *in vitro* での抗腫瘍効果を検討した。そのため、まず分子 B 特異的 TCR 遺伝子発現ベクターを作製し、健康人末梢血 T リンパ球に導入し、細胞表面への発現を確認した。次に、分子 B 特異的 TCR 導入 T リンパ球を用いて分子 B を内在に発現する細胞株に対する細胞傷害活性を測定したところ、分子 B に特異的な細胞傷害活性を確認した。

最後に不完全型抗分子 A-CAR (A-iCAR) と分子 B 特異的 TCR を発現させたハイブリッド T 細胞 (A-iCAR/B-TCR ハイブリッド T 細胞)の抗腫瘍効果の検討を行った。まず、A-iCAR および B-TCR 発現ベクターを作製し、健康人末梢血 T リンパ球へ導入したが、A-iCAR/B-TCR を共発現する細胞はほとんど得られなかった。そこで、A-iCAR/B-TCR を繋いだ発現ベクターを作製し、健康人末梢血 T リンパ球へ導入したところ、A-iCAR/B-TCR の共発現が確認できた。次に、A-iCAR/B-TCR ハイブリッド T 細胞の *in vitro* において細胞傷害活性を測定したところ、抗原特異的な強い細胞傷害活性が確認された。一方、iCAR/TCR はそれぞれ単独より導入効率が低いので、*in vivo* での解析また臨床応用する場合には導入効率を改善する必要があると考えられた。

機能的な抗分子 A-CAR による顕著な抗腫瘍活性認められたため、特許出願を行った。今後、患者検体を用いて *in vitro* および *in vivo* での抗腫瘍効果の検討を行う。さらに、医師主導治験へ展開するため、有効性、安全性に関する検討を進める。また、iCAR/TCR ハイブリッド T 細胞においても強い細胞傷害活性が認められたことから *in vivo* での抗腫瘍効果の検討を行う。

Chimeric antigen receptor (CAR)-T and T cell receptor (TCR)-T therapies will become the standard of care in cancer treatment around 2030 and are estimated to form a few trillion-yen market. However, the limited targets of CAR-T therapy, such as CD19-positive B lymphoma, and the strong side effects are important issues to be overcome. Under the situation, CAR-T therapies are being actively developed to overcome these issues. TCR-T therapy using cancer antigen-specific TCRs is also attracting attention as a new cancer immunotherapy and is being developed worldwide. However, clinical trials of TCRs against very limited antigen/HLA combinations have been conducted so far. The main reason for this is the difficulty in efficiently obtaining TCR genes that can effectively induce cancer regression.

Under such circumstances, we have focused on Molecule-A (undisclosed due to patent application), which is important for the immune system, and have clarified the function of Molecule-A using a humanized anti-molecule A antibody we have produced. At the same time, we have developed the ISAAC method (Jin et al Nat Med 2009), a technique for efficiently obtaining antigen-specific antibody genes from a single B cell, and the hTEC10 method (Kobayashi et al Nat Med 2013), a technique for comprehensively isolating and analyzing TCR genes from a single T cell. In this study, we tried to develop next-generation genetically engineered T cells that combine the advantages of CAR-T and TCR-T cell therapy by integrating our technologies. Specifically, we tried to develop a hybrid T cell that incorporates the incomplete CAR (iCAR) gene, which does not induce T cell activation by itself, and the specific TCR gene (undisclosed due to patent application). The Hybrid T cells have the function of specificity and signal transduction assistance by iCAR. Since iCAR alone does not activate T cells, iCAR can be used for antigens expressed on the T cells themselves. On the other hand, the signal from TCR can be enhanced by the signal from iCAR, and thus strong cytotoxic activity of T cells will be induced. Thus, hybrid T cells are expected to reduce side effects and expand the application to a wide range of cancer types due to their strong antigen-specific activation and dual specificity.

First, we investigated the *in vitro* and *in vivo* antitumor effects of functional anti-molecular A-CAR. To this end, we first generated an expression vector for anti-A-CAR and transfected it into healthy human peripheral blood T lymphocytes and confirmed its expression on the cell surface. Next, using these anti-molecular A-CAR transfected T lymphocytes, cytotoxic activity of anti-A-CAR against cell lines expressing molecular A was measured, and strong cytotoxic activity specific to molecular A was confirmed. Furthermore, after developing mouse model using highly immunodeficient mice (NSG mice), we examined anti-tumor effects of anti-A-CAR transduced-T cells *in vivo*. When anti A-CAR transduced T-cells were transferred, a significant tumor regression was observed.

Second, we examined anti-tumor effects of the molecular B-specific TCR *in vitro*. To this end, we constructed molecular B-specific TCR gene expression vector and transduced it into primary T cells, and confirmed its expression on the cell surface. Next, we measured cytotoxic activity of the B-specific TCR against a cell line that endogenously expresses molecular B using molecular B-specific TCR-transduced T lymphocytes, and confirmed cytotoxic activity specific for Molecular B.

Finally, we examined the anti-tumor effects of hybrid T cells expressing incomplete anti-molecular A-CAR (A-iCAR) and molecular B-specific TCR (A-iCAR/B-TCR hybrid T cells). First, A-iCAR and B-TCR expression vectors were generated separately and introduced into primary T cells, but few cells expressing both A-iCAR and B-TCR simultaneously were obtained. Therefore, we constructed an expression vector with A-iCAR/B-TCR tethered using 2A sequence and introduced it into primary T cells. Using the expression vector, we observed efficient co-expression of A-iCAR/B-TCR. Next, cytotoxic activity of A-iCAR/B-TCR hybrid T cells was measured *in vitro* as same with fCAR and TCR, and we observed strong cytotoxic activity of the hybrid T cells. On the other hand, the transfection efficiency of iCAR/TCR was still lower than that of each alone, suggesting the need to improve transfection efficiency for *in vivo* analysis and future clinical application.

Since effective anti-tumor activity was observed with the functional anti-molecular A-CAR, a patent application was filed. In the future, we will investigate the anti-tumor effect in vitro and in vivo using patient tumor which express molecular A. Since strong cytotoxic activity of iCAR/TCR hybrid T cells was observed in vitro, we will next investigate anti-tumor effects of the hybrid T cells in vivo. In addition, we will further investigate the efficacy and safety of iCAR/TCR hybrid T cell to apply it for clinical application.